

06.10.2004

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

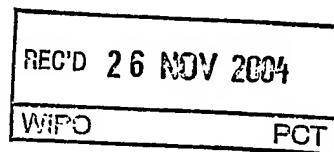
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 3 年 9 月 3 0 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 3 - 3 4 2 2 6 0
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 3 4 2 2 6 0]

出 願 人
Applicant(s): タカラバイオ株式会社

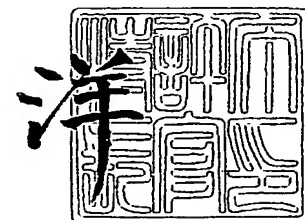


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 1 1 月 1 1 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 1 0 1 8 3 0

【書類名】 特許願
【整理番号】 T-1854
【提出日】 平成15年 9月30日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C12N 15/00
C12N 9/22

【発明者】
【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田三丁目 4 番 1 号 タカラバイオ株式会社内
【氏名】 友野 潤

【発明者】
【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田三丁目 4 番 1 号 タカラバイオ株式会社内
【氏名】 上野 はるみ

【発明者】
【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田三丁目 4 番 1 号 タカラバイオ株式会社内
【氏名】 佐川 裕章

【発明者】
【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田三丁目 4 番 1 号 タカラバイオ株式会社内
【氏名】 加藤 郁之進

【特許出願人】
【識別番号】 302019245
【氏名又は名称】 タカラバイオ株式会社
【代表者】 加藤 郁之進

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 173212
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

反応条件の制御が容易な RNase III 活性を有するポリペプチドであって、大腸菌由来の RNase III で dsRNA を処理して得られた最終分解物よりも大きい特定の範囲の dsRNA 分解物を得ることができることを特徴とするポリペプチド。

【請求項 2】

dsRNA 分解速度が、大腸菌由来の RNase III の dsRNA 分解速度よりも遅いことを特徴とする、反応条件の制御が容易な RNase III 活性を有するポリペプチド。

【請求項 3】

大腸菌由来の RNase III の dsRNA 分解速度よりも遅く反応条件の制御が容易なポリペプチドであって、約 10 塩基対前後の小さい dsRNA 分解物が生じにくい特性を有する RNase III 活性を有するポリペプチド。

【請求項 4】

低温性微生物由来であることを特徴とする請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 5】

低温性微生物がシェワネラ属微生物であることを特徴とする請求項 4 記載のポリペプチド。

【請求項 6】

下記から選択されるアミノ酸配列を含有することを特徴とする RNase III 活性を有するポリペプチドであって、大腸菌由来の RNase III で dsRNA を処理して得られた最終分解物よりも大きい特定の範囲の dsRNA 分解物を得ることができることを特徴とするポリペプチド。

(a) 配列表の配列番号 4 記載のアミノ酸配列、

(b) 配列表の配列番号 4 記載のアミノ酸配列において一ないしは複数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入あるいは付加されたアミノ酸配列；又は

(c) 配列表の配列番号 1 記載の塩基配列に厳密な条件下でハイブリダイズ可能な塩基配列でコードされるアミノ酸配列

【請求項 7】

核酸結合活性を有するタンパク質との融合タンパク質であることを特徴とする請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 8】

請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドを用いた dsRNA の分解方法。

【請求項 9】

dsRNA の分解物が RNA 干渉において siRNA として機能しうる dsRNA であることを特徴とする請求項 8 記載の方法。

【請求項 10】

核酸結合活性を有するタンパク質の存在下で実施することを特徴とする請求項 8 又は 9 記載の方法。

【請求項 11】

核酸結合活性を有するタンパク質が好熱性菌あるいは耐熱性菌由来のコールド ショック プロテインであることを特徴とする請求項 10 記載の方法。

【請求項 12】

コールド ショック プロテインがサーモトガ マリティマ由来のコールド ショック プロテイン B であることを特徴とする請求項 11 記載の方法。

【請求項 13】

請求項 8～12 記載の方法に用いる組成物であって、請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の RNase III 活性を有するポリペプチドを含有することを特徴とする dsRNA 分解用組成物。

【請求項 1 4】

請求項 8 ～ 1 2 記載の方法に用いるキットであって、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の R N a s e I I I 活性を有するポリペプチドを含有することを特徴とする d s R N A 分解用キット。

【書類名】明細書

【発明の名称】RNase III活性を有するポリペプチド

【技術分野】

【0001】

本発明は、新たに単離されたポリヌクレオチドおよびこのポリヌクレオチドによってコードされるRNase IIIを有するポリペプチド、このようなポリヌクレオチドおよびポリペプチドの使用、ならびにそれらの産生に関する。

【背景技術】

【0002】

RNase IIIは、二本鎖RNA (double stranded RNA: dsRNA) に特異的に作用し、5' -末端リン酸基を持つ平均15ヌクレオチド単位のオリゴヌクレオチドを生成することができる酵素である。当該酵素は、例えば、大腸菌の30S抽出液中に存在する。さらに類似酵素が、ウシ胸腺あるいはトリ胚に存在していることも報告されている。しかしながら、当該酵素は、RNA-RNAの二次構造を一本鎖RNAと識別する方法等に使用されるのがほとんどであった。(例えば、非特許文献1参照)

【0003】

一方、最近になってRNA干渉 (RNA干渉: RNA interference) と言う技術が報告された。当該技術は、dsRNAによってその配列特異的にmRNAが分解され、その結果遺伝子発現が抑制される現象に基づくものである。dsRNAによって遺伝子サイレンシングができることがわかった発端は、線虫におけるアンチセンスを用いた研究からであった。1995年、GuoとKempnesはpar-1と呼ばれる遺伝子をアンチセンスRNAで抑制する実験を行なった。アンチセンスRNAを加えると、予想通りpar-1の発現を抑制したが、驚いたことに、コントロールとして用いたセンスRNAも同様にpar-1の発現を抑制し、par-1変異株の表現形を示した。(例えば、非特許文献2参照)

この矛盾は、1998年にFireらによって解き明かされた。アンチセンスRNAとセンスRNAを、それぞれRNAポリメラーゼを用いて合成するとき、わずかに非特異的に逆向きのRNAができてしまう。そのコンタミネーションによってできるdsRNAが遺伝子サイレンシングの本体であり、アンチセンスRNAおよびセンスRNAは遺伝子の発現を抑制できないこと、またアンチセンスRNAとセンスRNAをアニールさせたdsRNAが効率よく遺伝子の発現を抑制できることが明らかとなった。(例えば、非特許文献3、特許文献1参照)

【0004】

上記RNA干渉においては、Dicerと呼ばれる酵素がdsRNAから小分子のRNA (siRNA: short interfering RNA) を生成させる。(例えば、非特許文献4、特許文献2参照)

この酵素の作用により生じたsiRNAは、RISC (RNA induced silencing complex) と呼ばれる複合体に取り込まれ、該複合体が標的mRNAを認識し、分解すると考えられている。しかしながら、RNA干渉に関与すると考えられる各因子についての正確な機能についてはまだまだ未知の部分が多いのが現状であった。(例えば、非特許文献5参照)

【0005】

一方、微生物由来のRNase IIIもsiRNAの調製に利用される。(非特許文献6参照) 前記RNase IIIとしては、例えばエピセントル社 (EPICENTRE社)、アンビオン社 (Ambion社) から大腸菌由来のRNase IIIが発売され、siRNAの調製に使用されている。しかしながら、大腸菌由来のRNase IIIは反応性が高く、例えば500塩基対以上の長鎖のdsRNAを鋳型とした場合でもすぐに約10塩基対程度の低分子のものに分解してしまう。この場合、RNA干渉に有効とされる約21塩基対のsiRNAを調製する際には、長鎖dsRNAの部分分解を反応温度を下げる、または反応時間を短くするなどの条件改変により実施しなければならないが、前述の

ように大腸菌由来のRNase IIIは反応性が高いため、その反応条件の制御が困難であり、また部分分解条件においても前述の低分子のものが生じやすいという欠点を有していた。

以上のように、2本鎖RNAからRNA干渉を実施する際に効果の望める長さのsiRNAを調製する際に、反応条件の制御が容易で、さらにRNA干渉の効果の低い低分子のものが生じにくいRNase IIIが求められていた。

【0006】

【特許文献1】米国特許第6506559号公報

【特許文献2】国際公開第01/68836号パンフレット

【非特許文献1】Enzyme Nomenclature (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>)、EC 3.1.26.3

【非特許文献2】Guo S. 他1名 Cell 1995年 vol. 81、p 611-620

【非特許文献3】Fire A. 他5名 Nature 1998年 vol. 39、p 806-811

【非特許文献4】Bernstein E. 他3名 Nature 2001年 vol. 409、p 363-366

【非特許文献5】Tabara H. 他3名 Cell 2002年 vol. 109、p 861-871

【非特許文献6】Zhang H. 他4名 The EMBO Journal 2002年 vol. 21, No. 21, p 5875-5885

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の目的は、反応条件によるdsRNA分解産物の長さの制御が容易で、さらにRNA干渉においてsiRNAとして機能し得る長さのdsRNAを調製する際に、RNA干渉の効果の低い低分子物のものが生じにくいRNase III活性を有する新規ポリヌクレオチドを提供することにある。また、該ポリヌクレオチドを用いた、従来とは異なったより効率的なsiRNAの調製方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、反応条件の制御が容易という観点から常温菌由来のRNase IIIの場合よりも低い温度で熱失活させることが可能で、その温度感受性を利用して温和な分解条件を設定することが可能となるようなRNase III活性を有するポリヌクレオチドについて鋭意検討した結果、低温性微生物由来のRNase III活性を有するポリペプチドが反応条件によるdsRNA分解産物の長さの制御が容易で、さらにRNA干渉においてsiRNAとして機能し得る長さのsiRNAを調製する際に、RNA干渉の効果の低い低分子物のものが生じにくいRNase III活性を有することを見出した。また、4℃においても生育可能な低温性微生物 *Shewanella* sp. *Ac10* 由来のRNase III活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドのクローニングを試み、目的のRNase III活性を有するポリペプチドを発現させることに成功し、該RNase IIIの活性が、siRNA調製時に好適であることを見出し、本発明を完成させた。

【0009】

すなわち、本発明の第1の発明は、反応条件の制御が容易なRNase III活性を有するポリペプチドであって、大腸菌由来のRNase IIIでdsRNAを処理して得られた最終分解物よりも大きい特定の範囲のdsRNA分解物を得ることができることを特徴とするポリペプチドに関する。

【0010】

本発明の第2の発明は、dsRNA分解速度が、大腸菌由来のRNase IIIのds

RNA分解速度よりも遅いことを特徴とする、反応条件の制御が容易なRNase III活性を有するポリペプチドに関する。

【0011】

本発明の第3の発明は、大腸菌由来のRNase IIIのdsRNA分解速度よりも遅く反応条件の制御が容易なポリペプチドであって、約10塩基対前後の小さいdsRNA分解物が生じにくい特性を有するRNase III活性を有するポリペプチドに関する。

【0012】

本発明の第1～3の発明においては、当該ポリペプチドは、低温性微生物由来であることが好ましく、特に限定はされないが例えば、シェワネラ属微生物であることが好ましい。

【0013】

本発明の第4の発明は、下記から選択されるアミノ酸配列を含有することを特徴とするRNase III活性を有するポリペプチドであって、反応条件に応じて大腸菌由来のRNase IIIでdsRNAを処理して得られた最終分解物よりも大きい特定の範囲のdsRNA分解物を任意に得ることができることを特徴とするポリペプチドであり、

(a) 配列表の配列番号4記載のアミノ酸配列、

(b) 配列表の配列番号4記載のアミノ酸配列において一ないしは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入あるいは付加されたアミノ酸配列；又は

(c) 配列表の配列番号1記載の塩基配列に厳密な条件下でハイブリダイズ可能な塩基配列でコードされるアミノ酸配列、に関する。

【0014】

本発明の第5の発明は、核酸結合活性を有するタンパク質との融合タンパク質である本発明の第1～第4の発明のポリペプチドに関する。

【0015】

本発明の第6の発明は、本発明の第1～第5の発明のポリペプチドを用いたdsRNAの分解方法に関する。

【0016】

本発明の第6の発明において、特に限定はされないがdsRNAの分解物はRNA干渉においてsiRNAとして機能しうるdsRNAであるものが例示される。また、本発明の方法においては、核酸結合活性を有するタンパク質の存在下で実施しても良く、使用するポリペプチドが、核酸結合活性を有するタンパク質と本発明の第1～第3の発明のポリペプチドとの融合タンパク質であっても良い。当該核酸結合活性を有するタンパク質は、特に限定はされないが例えば好熱性菌あるいは耐熱性菌由来のコールド ショック プロテインが例示される。特に限定はされないが例えば、当該コールド ショック プロテインは、サーモトガ マリティマ由来のコールド ショック プロテインBが挙げられる。

【0017】

本発明の第7の発明は、本発明の第6の発明に記載の方法に用いる組成物であって、本発明の第1～第5の発明のポリペプチドを含有することを特徴とするdsRNA分解用組成物に関する。

【0018】

本発明の第8の発明は、本発明の第6の発明に記載の方法に用いるキットであって、本発明の第1～第5の発明のポリペプチドを含有することを特徴とするdsRNA分解用キットに関する。

【発明の効果】

【0019】

本発明により、反応条件の制御が容易な低温性微生物由来のRNase III活性を有するポリペプチドが提供される。さらに本発明のポリペプチドを用いることにより、RNA干渉においてsiRNAとして機能し得る長さのdsRNAを簡便に、効率よく生成させる方法が提供される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0020】

本明細書においてRNase III活性を有するポリペプチドとは、2本鎖RNA (double stranded RNA: dsRNA) を分解するエンドヌクレアーゼのことを言い、一般にはdsRNAを完全に消化することで10塩基対程度の小断片dsRNAを生成する。上記ポリペプチドは、天然型あるいは人工的に修飾されたもののいずれのdsRNAをも基質として分解することができる。特に限定はされないが例えば、fluorine-CMP w 2'-fluorine-UMPで置き換えたdsRNA等が例示される。

【0021】

本明細書においてdsRNAとは、2本鎖構造を形成したRNAのことであり、特に限定はされないが例えばRNA干渉の対象となるmRNAと該mRNAに相補的な塩基配列を有するRNAとの2本鎖構造を形成したRNAのことを言う。

上記dsRNAには2本鎖構造を保持したRNA分解物も含まれる。その中には、RNA干渉に有用なsi (short interfering) RNAも含まれる。また、上記dsRNAならびにその分解物には3' 及び/又は5' 末端側に一本鎖部分があってもよい。

【0022】

本明細書において、RNA干渉においてsiRNAとして機能し得るdsRNAとは、特に限定はされないが例えば、約10~100塩基対の範囲中の特定の長さのdsRNAのことを言う。さらに例えば、RNA干渉においてsiRNAとして機能し得る長さのsiRNAとは約15~30塩基対の範囲、特に20~25塩基対の範囲のdsRNAであっても良い。

【0023】

本明細書において反応条件の制御が容易とは、特に限定はされないが例えば、dsRNA分解反応の場合、当該分解反応において反応速度が遅く、生成する低分子産物を目安 (dsRNA分解産物の長さを目安に) に部分分解の条件を設定し易いもののことを言う。言い換えれば、低分子産物が生じにくいものが好ましい。上記反応条件の制御が容易な酵素を産生するものとしては、特に限定はされないが例えば下記に示す低温性微生物由来のものが好適に使用できる。

【0024】

微生物は、生育できる温度範囲の違いによって、高温性、中温性、低温性微生物に大別される。この低温で生育できる微生物はさらに生育できなくなる上限温度と最適生育温度によって、低温微生物と好冷微生物に細分され、生育限界温度20℃以下で最適生育温度15℃以下のものを好冷微生物、生育限界温度20℃以上のものを低温性微生物と一般に呼称されている。本明細書において、低温性微生物とは、上記低温性微生物のことを言う。本発明において遺伝子源として使用できる微生物は、特に属、種あるいは株などを限定するものではないが、例えばシェワネラ (Shewanella) 属などに分類される低温性微生物等を用いることができる。これらの微生物については公的微生物寄託機関において容易に入手できる。前記シェワネラ属微生物の例として、シェワネラ・ピュートリファシエンス (Shewanella putrefaciens) SCRC-2874 (FERM BP-1625) あるいは、シェワネラ属 Ac10株等が例示される。当該シェワネラ属 Ac10株は、Shewanella sp. Ac10と表示され、平成13年11月13日 (原寄託日) より日本国〒305-8566茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターにShewanella sp. AC10 (受託番号FERM P-18597) として寄託されている。しかしながら、前記したように、種々の低温性微生物を同様にして遺伝子源として使用することができることは言うまでもない。

【0025】

以下、本発明を詳細に説明する。

(1) 本発明のRNase III活性を有するポリペプチド並びに該ポリペプチドをコー

ドするポリヌクレオチド

本発明のRNase III活性を有するポリペプチドは、反応条件の制御が容易なポリペプチドである。特に限定はされないが例えば、反応条件の制御が容易なRNase III活性を有するポリペプチドであって、大腸菌由来のRNase IIIでdsRNAを処理して得られた最終分解物よりも大きい特定の範囲のdsRNA分解物を得ることができることを特徴とするポリペプチドが例示される。

また、本発明のポリペプチドは、大腸菌由来のRNase IIIのdsRNA分解速度よりも遅く反応条件の制御が容易なポリペプチドであって、約10塩基対前後の小さいdsRNA分解物が生じにくい特性を有していても良い。

すなわち、本発明のポリペプチドは、反応条件（温度、時間、酵素濃度等）を任意に設定することにより、今まで大腸菌由来のRNase IIIでは困難であった、特定の範囲のdsRNAを容易に得ることができる。

【0026】

さらに本発明のポリペプチドの別態様としては、dsRNA分解速度が、大腸菌由来のRNase IIIのdsRNA分解速度よりも遅いことを特徴とする、反応条件の制御が容易なRNase III活性を有するポリペプチドが例示される。

本発明においては、特に限定はされないが例えば、大腸菌由来のRNase IIIと比較してdsRNA分解活性が遅いものが好ましく、その反応速度が1時間反応させても約10塩基対程度の断片が生じにくいものが好ましい。

本発明のRNase III活性を有するポリペプチドは、大腸菌由来のRNase IIIよりもdsRNA分解速度が遅いため、反応時間、反応温度等を選択することにより、任意の特定の長さのdsRNAを調製することができる。前記特性を利用することにより、これまでの大腸菌由来のRNase IIIでは困難であった、dsRNAの部分分解も実施することができる。さらに、本発明のRNase III活性を有するポリペプチドは、大腸菌由来のRNase IIIよりもRNA干渉においてsiRNAとして機能し難い低分子のdsRNAが生成しにくいポリペプチドである。言い換えれば、当該ポリペプチドは、大腸菌由来のRNase IIIに比較して、長鎖dsRNA（約500～1000塩基対）の分解速度が遅く、また約10塩基対程度の低分子分解物が生じにくいことから、RNA干渉においてsiRNAとして機能し得るdsRNAをより簡便に、効率的に調製することができる。

【0027】

本発明のポリペプチドは、RNA干渉においてsiRNAとして機能し得るdsRNAを調製することができる。特に限定はされないが、配列表の配列番号4記載のアミノ酸配列を有するものが例示される。また、本発明のRNase III活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとしては、配列表の配列番号1記載の塩基配列を有するものが挙げられる。また、上記機能を有する範囲であれば上記アミノ酸配列あるいは塩基配列において、一ないしは複数のアミノ酸あるいは塩基の置換、欠失、挿入あるいは付加されたものも本発明のRNase III活性を有するポリペプチドに含まれる。特に限定はされないが、例えば配列表の配列番号5記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドが挙げられる。

【0028】

さらに配列番号1で表わされるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、相当する配列番号1で表わされるポリヌクレオチドがコードするポリペプチドと同等のdsRNA分解活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも含まれる。上記「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」とは、特に限定はされないが、例えば、モレキュラー クローニング ア ラボラトリー マニュアル 第3版 [サンブрук (Sambrook) ら、Molecular cloning, A laboratory manual 3rd edition、2001年、コールド スプリング ハーバー ラボラトリー プレス (Cold Spring Harbor Laboratory Press) 社発行] 等の文献に記載の条件が挙げられ、6×

SSC (1×SSCは、0.15M NaCl、0.015M クエン酸ナトリウム、pH7.0)と0.5% SDSと5×デンハルト [Denhardt's、0.1%ウシ血清アルブミン (BSA)、0.1%ポリビニルピロリドン、0.1%フィコール400]と100 μg/ml サケ精子DNAとを含む溶液中、用いるプローブのT_m-25℃の温度で一晩保温する条件等が挙げられる。

【0029】

より低いストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件で本発明のポリヌクレオチドにハイブリダイズする核酸分子もまた本発明に包含される。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーおよびシグナル検出の変化は、主として、ホルムアミド濃度（より低い百分率のホルムアミドが、低下したストリンジェンシーを生じる）、塩濃度、または温度の操作によって行われる。例えば、より低いストリンジェンシー条件は、6×SSPE (20×SSPE=3M NaCl; 0.2M NaH₂PO₄; 0.02M EDTA、pH7.4)、0.5% SDS、30%ホルムアミド、100 μg/ml サケ精子ブロッキングDNAを含む溶液中での37℃での一晩インキュベーション; 次いで1×SSPE、0.1% SDSを用いた50℃での洗浄を含む。さらに、より低いストリンジェンシーを達成するために、ストリンジェントなハイブリダイゼーション後に行われる洗浄は、より高い塩濃度（例えば、5×SSC）で行うことができる。

【0030】

上記の条件は、ハイブリダイゼーション実験においてバックグラウンドを抑制するために使用される代替的なブロッキング試薬を添加および/または置換することによって改変することができる。代表的なブロッキング試薬としては、デンハルト試薬、BLOTTING、ヘパリン、変性サケ精子DNA、および市販の製品処方物が挙げられる。また、この改変に応じて、上記のハイブリダイゼーション条件の他の要素の改変が必要な場合もある。

【0031】

本発明のポリヌクレオチドは、任意のポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドから構成され得、これは、非改変RNAもしくは非改変DNAまたは改変RNAもしくは改変DNAであり得る。例えば、ポリヌクレオチドは、一本鎖および二本鎖DNA、一本鎖および二本鎖領域の混合物であるDNA、一本鎖および二本鎖RNA、ならびに一本鎖および二本鎖領域の混合物であるRNA、一本鎖、またはより代表的には二本鎖もしくは一本鎖および二本鎖領域の混合物であり得るDNAおよびRNAを含むハイブリッド分子から構成され得る。当該ポリヌクレオチドはまた、安定性のために、または他の理由のために改変された1つ以上の改変された塩基またはDNAもしくはRNA骨格を含み得る。「改変された」塩基としては、例えば、トリチル化された塩基およびイノシンのような普通でない塩基が挙げられる。種々の改変が、DNAおよびRNAに対して行われ得、したがって、「ポリヌクレオチド」は、化学的、酵素的、または代謝的に改変された形態を含む。

【0032】

遺伝子操作による上記酵素、ポリペプチドの製造方法としては、例えば、該RNase IIIをコードするDNA配列が宿主生物での酵素発現機能を有する適当なプロモーター、オペレーター及びターミネーター配列と共に、宿主生物中で複製されるベクターに挿入されたプラスミドを用いて形質転換された宿主細胞、または該プロテアーゼをコードするDNA配列が宿主生物での酵素発現機能を有する適当なプロモーター、オペレーター及びターミネーター配列と共に、宿主細胞DNAにインテグレーションされることで形質転換された宿主細胞を、RNase IIIの発現できる条件のもとに培養し、さらにRNase IIIを培養液から回収する方法が挙げられる。

【0033】

また、本発明のRNase IIIは、該RNase IIIをコードするポリヌクレオチド等を基にして得られる該RNase IIIのアミノ酸配列に関する知見を基に、従来のRNase IIIをコードするDNAを改変する遺伝子工学の手法によって生産されるものであってもよい。

特に限定はされないが、本発明のRNase III活性を有するポリペプチドにおいて、さらに発現ベクター由来の配列、例えば、発現あるいは翻訳増強配列（例えば、Perfect DB配列等）、発現タンパク質精製のタグ配列（例えば、His tag配列等）、あるいは発現タンパク質のN末端側の付加配列を除去するための配列（例えば、Factor Xa配列等）などのアミノ酸配列を付加したものも本発明のdsRNA分解活性を有するタンパク質に含まれる。前記ポリペプチドとしては、特に限定はされないが、例えば配列表の配列番号5記載のアミノ酸配列を有するRNase III活性を有するポリペプチドが挙げられる。

さらに、本発明のRNase III活性を有するポリペプチドは、核酸結合活性を有するタンパク質、例えばRNA合成活性を有するタンパク質との融合タンパク質の形態のものであってもよい。

【0034】

本発明のRNase III活性を有するポリペプチドを製造するためのベクターには、特に限定はなく、市販のベクター、発現系のいずれもが使用できる。特に、限定はされないが例えばpETシステム（ノバジェン社製）を用いることができる。さらに、低温で機能し得るプロモーターを有するベクターが好適に使用でき、例えば国際公開第99/27117号パンフレットに記載のpCold系ベクターが挙げられる。

本発明の製造方法の一態様としては、国際公開第99/27117号パンフレットに記載のpCold系ベクターで製造する方法が例示される。

すなわち、本発明の製造方法においては、siRNAを生成させ得る機能を保持できるポリペプチドを発現できるベクターであればいずれもが好適に使用できる。

また、当該siRNAを生成させ得る機能を最終的に保持できるポリペプチドを得られるならば、ポリペプチド発現時は封入体の形態であるがその後のリホールディング操作により当該機能を回復できるものを発現できるベクターも含まれる。

【0035】

本発明のRNase IIIを採取するには、一般の大腸菌組み換え酵素採取の手段に準じて行えば良い。即ち、大腸菌組み換え体を培養後、遠心分離、濾過等の通常の見分手段により菌体を培養液から分離することができる。この菌体を破碎して無細胞抽出液を調製し、粗酵素液として以下の精製操作に用いる。また、酵素が菌体外に分泌されている場合には、菌体が除去された培養液上清を粗酵素液とすることができる。この粗酵素液はそのまま使用することもできるが、必要に応じて、限外濾過、沈澱法等の手段により回収し、適当な方法を用いて粉末化して用いることもできる。また、酵素精製の一般的手段、例えば適当な陽イオン交換樹脂、陰イオン交換樹脂、ヒドロキシアパタイト等によるクロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲル濾過等の組合わせによって精製することもできる。

【0036】

(2) 本発明のポリペプチドを用いたdsRNAの分解方法

本発明のdsRNAの分解方法は、上記(1)記載のポリペプチドを用いることを特徴とする。本発明の方法において、上記ポリペプチドを用いることにより、反応条件（時間、温度、酵素濃度等）を制御することにより、例えば特定の範囲のsiRNAを調製することができる。特に限定はされないが例えば、大腸菌RNase IIIより温和な反応条件、30℃の反応温度で反応でき、RNA干渉の際に効果的に望める長さのsiRNAをより簡便に、効率的に調製することができる。

【0037】

さらに本発明の方法においては、核酸結合活性を有するタンパク質の存在下に行うことを特徴とする。当該核酸結合タンパク質としては、結果的にdsRNA分解活性を促進するものであれば特に限定はなく、例えば、上記RNA結合活性を有するタンパク質等が好適に使用できる。

当該RNA結合活性を有するタンパク質としては特に限定はないが、コールド ショック プロテイン（Csp: cold shock protein）が例示される。特に

常温域で機能し得るコールド ショック プロテインが好適に使用でき、好熱性菌あるいは耐熱性菌由来のコールド ショック プロテインが好ましい。特に限定はされないが、例えば配列表の配列番号12記載のアミノ酸配列（配列表の配列番号13記載の塩基配列でコードされるアミノ酸配列）を有するサーモトガ マリティマ（*Thermotoga maritima*）由来のCspBタンパク質が好適に使用できる。

当該CspBタンパク質を上記（1）記載のポリペプチドと組み合わせることにより、当該dsRNA分解活性を促進させることができる。さらに、本発明の方法においては、当該核酸結合活性を有するタンパク質、例えばRNA合成活性を有するタンパク質は、本発明のRNaseIII活性を有するポリペプチドとの融合タンパク質の形態のものであってもよい。

【0038】

（3）本発明の方法に使用される組成物

本発明の組成物は、特定の長さのdsRNAに分解する反応を効率よく行うための組成物であり、例えばRNA干渉の際に効果の望める長さのsiRNAを効率よく調製するための組成物である。当該組成物は、上記（1）記載のRNaseIII活性を有するポリペプチドを含む組成物である。

上記RNaseIII活性を有するポリペプチドにおいて、さらに発現ベクター由来の配列、例えば、発現あるいは翻訳増強配列（例えば、Perfect DB配列等）、発現タンパク質精製のタグ配列（例えば、His tag配列等）、あるいは発現タンパク質のN末端側の付加配列を除去するための配列（例えば、Factor Xa配列等）などのアミノ酸配列を付加したポリペプチドであっても良い。前記ポリペプチドとしては、特に限定はされないが、例えば配列表の配列番号5記載のアミノ酸配列を有するRNaseIII活性を有するポリペプチドが挙げられる。また、本発明の組成物には、上記ポリペプチドを安定化させるための緩衝液を含んでいてもよい。

【0039】

さらに当該組成物は、核酸結合活性を有するタンパク質を含んでいてもよく、当該核酸結合活性を有するタンパク質は特に限定はされないが、コールド ショック プロテイン（Csp: cold shock protein）が好適に使用でき、配列表の配列番号12記載のアミノ酸配列（配列表の配列番号13記載の塩基配列でコードされるアミノ酸配列）を有するサーモトガ マリティマ（*Thermotoga maritima*）由来のCspBタンパク質が好ましい。

【0040】

さらに本発明の組成物の別態様としては、上記の核酸結合活性を有するタンパク質と本発明のRNaseIII活性を有するポリペプチドとの融合タンパク質を含有していてもよい。

【0041】

（4）本発明の方法に使用されるキット

本発明の方法に使用されるキットは、特定の長さのdsRNAに分解する反応を効率よく行うためのキットであり、例えばRNA干渉の際に効果の望める長さのsiRNAを効率よく調製するためのキットである。

本発明のキットには、RNaseIII活性を有するポリペプチドを含んでいてもよい。該RNaseIII活性を有するポリペプチドとしては、上記（1）で挙げられたものが好適に使用できる。さらに本発明のキットには、上記ポリペプチドを安定化させるための緩衝液を含んでいてもよい。

【0042】

さらに当該キットは、核酸結合活性を有するタンパク質を含んでいてもよく、当該核酸結合活性を有するタンパク質は特に限定はされないが、コールド ショック プロテインが好適であり、例えば、好熱性菌あるいは耐熱性菌由来のコールド ショック プロテイン（Csp: cold shock protein）が好適に使用でき、配列表の配列

番号12記載のアミノ酸配列（配列表の配列番号13記載の塩基配列でコードされるアミノ酸配列）を有するサーモトガ マリティマ (*Thermotoga maritima*) 由来のCspBタンパク質が好ましい。

【0043】

さらに本発明のキットの別態様としては、上記の核酸結合活性を有するタンパク質と本発明のRNase III活性を有するポリペプチドとの融合タンパク質を含有していてもよい。

【0044】

さらに、本発明のキットには、上記以外のコンポーネント、例えば基質となるdsRNAの合成を行なうための試薬、反応の結果生成された特定の長さのdsRNAを精製するための試薬、それを生体サンプルに導入する試薬等を含有していても良い。特に限定はされないが例えば、分解産物であるsiRNAを精製するための試薬、それを生体サンプルに導入する試薬等を含有していても良い。

本発明のキットを用いることで、RNA干渉の際に効果の望める長さのsiRNAを簡便に、効率的に調製することができる。

【実施例】

【0045】

以下に実施例を示し、本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって制限されるものではない。

【0046】

実施例1 ショットガンライブラリーの調製

(1) ゲノムDNAの調製

平成13年11月13日（原寄託日）より日本国〒305-8566茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターにShewanella sp. AC10（受託番号FERM P-18597）として寄託されているシュワネラ属 (*Shewanella* sp.) Ac10株を0.15g/mlトリプトン、0.01g/ml酵母エキス、0.3g/ml塩化ナトリウム、0.01g/mlグルコース、11.5mMリン酸水素二カリウム、7.4mMリン酸二水素カリウム、4mM硫酸マグネシウムを含む培地5mlに植菌し、15℃で40時間培養した。この培養液を5000rpmで1分間遠心分離を行ない、沈殿物として得られた菌体を25mM Tris-HCl緩衝液（pH8.0）、50mMグルコース、10mM EDTA溶液500μlに懸濁した。この懸濁液に10% SDSを50μl添加し、よく混和した後20mg/ml Protease K（タカラバイオ社製）を5μl加えて50℃で3時間保温した。さらに、クロロホルムを500μl加えて30分間ゆっくり振とうし、10000g、10分間、遠心し、上清を分取後1.5mlのエタノールを添加した。綿状になったゲノムDNAをチップで絡め取り、70%エタノールでの洗浄を2回行なった後、50℃で乾燥させ1mM Tris-HCl緩衝液（pH7.5）、0.1mM EDTA溶液100μlに溶解させ、ゲノムDNA溶液を得た。

【0047】

(2) ライブラリーの作成

実施例1-(1)で得られたゲノムDNA溶液を2μg/200μlに調製し、このゲノムDNAをHydrosheer (GENE MACHINES社製)を用いて、サイクル20、スピード4の条件で、平均鎖長が1.0kbpとなるように切断した。この切断DNA溶液にPellet paint (Novagen社製)を2μl、3M酢酸ナトリウム（pH5.2）を20μl、エタノールを600μl加えてエタノール沈殿を行ない、沈殿を乾燥後、20μlのTE緩衝液（10mM Tris-HCl緩衝液（pH7.5）、1mM EDTA）に溶解した。この溶液のうち5μlを、TaKaRa BKL Kit（タカラバイオ社製）を用いて、平滑化反応、リン酸化反応、ライゲーション反応を添付のプロトコールに従い行なった。なお、ライゲーション反応のベクターとして、pUC18 Sma I/BAP（アマシャム ファルマシア社製）及びpUC1

18 HincII/BAP (タカラバイオ社製) を用いた。上記キットを用いて得られた溶液をTE緩衝液で100 μ lにし、フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行ない、20 μ lのTE緩衝液に溶解させた。このライゲーション溶液に、大腸菌コンピテントセルとしてDH10B electro cell (GIBCO BRL社製) を50 μ l加え、GenePulser (BIO RAD社製) を用いて、1.5kV、200 Ω 、25 μ Fの条件でエレクトロポレーションを行なった。この溶液に、1ml SOC培地を加えて37 $^{\circ}$ Cで1時間振とうし、100 μ g/ml アンピシリン、100 μ g/ml IPTG、40 μ g/mlを含むLB寒天培地で培養を行なった。その結果、およそ1000個のコロニーが得られ、一部のコロニーについてPCR反応によるインサートチェックを行い、400万個のクローンからなるショットガンライブラリーを調製した。

【0048】

実施例2 ゲノム配列の解析

(1) ゲノム配列の決定

実施例1で得られたショットガンライブラリーのそれぞれの大腸菌クローン43200個から、以下の方法でプラスミドDNAを調製した。大腸菌クローンを1g/ml トリプトン、0.5g/ml 酵母エキス、1g/ml 塩化ナトリウムを含む培養液 200 μ lで37 $^{\circ}$ C、14時間の条件で培養した。この培養液を5000rpmで1分間遠心分離を行ない、沈殿物として得られた菌体をプラスミド抽出ロボット (BECKMAN社製) を用いて、25mM Tris-HCl緩衝液 (pH8.0)、50mM グルコース、10mM EDTAを含む溶液 80 μ lに懸濁し、0.2N 水酸化ナトリウム、1% SDS溶液を含む溶液 80 μ lを加え、さらに3M 酢酸カリウム (pH5.2) 溶液 80 μ lを添加した。この懸濁液をNAプレート (ミリポア社製) に移し吸引して菌体残渣を除き、清浄した溶液を8M グアニジン溶液150 μ lを加えたFBプレート (ミリポア社製) に移した。さらに吸引操作によりFBプレートにプラスミドDNAを吸着し、80%エタノールで3回洗浄後、10mM Tris-HCl緩衝液 (pH8.0)、1mM EDTA溶液 70 μ lでプラスミドDNAを溶出した。

【0049】

このプラスミドDNA2 μ lに、滅菌水0.875 μ l、10pmol/ μ l濃度のM13-47ならびにRV-Mプライマー (いずれもタカラバイオ社製) を0.125 μ l、DynamicET 2 μ lを加え、95 $^{\circ}$ C 30秒、50 $^{\circ}$ C 20秒、60 $^{\circ}$ C 1分20秒を1サイクルとする40サイクルのPCR条件で反応を行ない、反応溶液をシーケンサーMegaBACE 1000 (アマシャム ファルマシア社製) を用いて塩基配列の解析を行なった。こうして得られた塩基配列データをコンピュータープログラムCAP4 (Prace社製) により、集合、整列、解析を行ない、1つのゲノム配列として構築した。

【0050】

(2) 遺伝子の解析

上記実施例2-(1)で得られたゲノム配列から、コンピュータープログラムGenmark v. 2.4c (Gene Probe, Inc.) を用いてORF解析を行なったところ、4935個のORFが予測された。これらのORFについて、コンピューターアルゴリズムBLAST (Ver 2.0) を用いて、遺伝子データベースGenBankでのホモロジーサーチを行なったところ、3075個のORFについてその機能が推定され、BLAST検索によりそれぞれのORFにどの酵素とホモロジーがあるのかの情報を得た。その中から低温性微生物であるシュワネラ sp. Ac10株より、配列表の配列番号1記載の塩基配列を有する目的のNaseIIIと推定される遺伝子を取得した。

【0051】

実施例3 RNaseIIIのクローニングと発現

(1) 発現ベクターの構築

以下のようにして発現ベクターを構築した。

まず、実施例2-(2)で得られたRNase IIIの塩基配列より、配列表の配列番号2及び3記載の塩基配列を有する合成プライマー1及び2をDNA合成機で合成し、常法により精製した。上記合成プライマー1は、制限酵素EcoRIの認識配列を塩基番号11~16に、さらに上記RNase IIIのアミノ酸配列(配列番号4)のアミノ酸番号1~7に相当する塩基配列を塩基番号18~37にもつ合成DNAである。また、合成プライマー2は、制限酵素BamHIの認識配列を塩基番号11~16に、さらにRNase IIIのアミノ酸配列(配列番号4)のアミノ酸番号221~226に相当する塩基配列を塩基番号20~37にもつ。

【0052】

次に上記合成プライマーを用いて、PCRを行った。PCRの反応条件を以下に示す。

すなわち、実施例1-(1)で調製したゲノムDNA1 μ l、10 μ lの10 \times Pyrobest buffer(タカラバイオ社製)、8 μ lのdNTP混合液(タカラバイオ社製)、それぞれ20pmolの合成プライマー1及び2、5UのPyrobest DNAポリラーゼ(タカラバイオ社製)、10 \times 添付緩衝液10 μ lを加え、滅菌水を加えて全量を100 μ lとした。前記反応液をTaKaRa PCR Thermal Cycler MP(タカラバイオ社製)にセットし、94 $^{\circ}$ C 30秒、55 $^{\circ}$ C 30秒、72 $^{\circ}$ C 2分を1サイクルとする30サイクルの反応を行なった。

【0053】

反応終了後、該反応液5 μ lを1.0%アガロースゲル電気泳動に供した。確認された目的の約680bpのDNAフラグメントを電気泳動ゲルより回収・精製し、エタノール沈殿を行なった。エタノール沈殿後の回収DNAを64 μ lの滅菌水に懸濁し、制限酵素EcoRI(タカラバイオ社製)及び制限酵素BamHI(タカラバイオ社製)で2重消化し、1.0%アガロース電気泳動によりそのEcoRI-BamHI消化物を抽出精製し、EcoRI-BamHI消化DNA断片を得た。

【0054】

次に平成9年10月31日(原寄託日)より独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター(日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6(郵便番号305-8566))にFERM P-16496として寄託され、前記独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに受託番号FERM BP-6523(国際寄託への移管請求日:平成10年9月24日)として寄託されているEscherichia coli JM109/pMM047と命名、表示されたプラスミドベクターpMM047で形質転換された大腸菌JM109を培養し、常法によりプラスミドベクターpMM047を精製し、当該ベクターを基に国際公開第99/27117号パンフレットの実施例1~6記載の方法に従い、pCold08NC2ベクターを調製した。

【0055】

上記pCold08ベクターは、上記EcoRI-BamHI消化DNA断片断片を調製した時に用いたのと同じ制限酵素で切断し、末端を脱リン酸処理した後、上記EcoRI-BamHI消化DNA断片と混合し、DNAライゲーションキットver.1(タカラバイオ社製)を用いて連結した。その後、ライゲーション反応液20 μ lを用いて大腸菌JM109を形質転換し、その形質転換体を1.5%(w/v)濃度の寒天を含むLB培地(アンピシリン50 μ g/ml含む)上で生育させた。

【0056】

目的のDNA断片が挿入されたプラスミドは、シーケンシングすることにより確認し、この組み換えプラスミドをpCold08 SHE-RNIIIとした。当該プラスミドは、plasmid pCold08 SHE-RNIIIと命名、表示され、平成15年9月22日より独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター(日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6(郵便番号305-8566))にFERM P-19526として寄託されている。

【0057】

(2) 発現、精製

上記実施例3-(1)で調製したpCold08 SHE-RNIIIを用いて大腸菌BL21を形質転換し、その形質転換体を1.5% (w/v) 濃度の寒天を含むLB培地(アンピシリン50 μ g/ml含む)上で生育させた。生育したコロニーを2.5mlのLB液体培地(アンピシリン50 μ g/ml含む)に植菌し、37℃で一晩培養した。この一部を100mlの同LB培地に植菌し、37℃で対数増殖期まで培養した。前記培養後、15℃に保温したインキュベーター内で10分間振とうした後、IPTGを終濃度1.0mMになるように添加し、そのまま15℃で24時間培養して発現誘導させた。その後菌体を遠心分離により集め、5mlの細胞破碎溶液[50mM トリス-塩酸緩衝液(pH8.5)、100mM 塩化ナトリウム、0.5mM EDTA、1%トライトン(Triton) X-100、1mM ジチオスレイトール、2mM フェニルメチルスルフォニルフルオリド]に再懸濁した。超音波破碎により菌体を破碎し、遠心分離(11,000rpm 20分)により上清の抽出液と沈殿とに分離した。

【0058】

上記上清の抽出液 約5mlを用いてさらにニッケルカラムによる精製を以下のように行なった。

すなわち、樹脂容積にして1ml分のNi-NTA agarose (キアゲン社製)にbuffer A [20mM トリス-塩酸緩衝液(pH8.5)、100mM 塩化ナトリウム、1mM ジチオスレイトール、0.1%トライトンX-100]を10ml添加し、混和後、1,500 rpmで数分間遠心し、上清を廃棄して、約1mlの樹脂を回収した。菌体破碎液より調製した約5mlの上清を添加し、4℃で約1時間、ロータリーシェイカーで穏やかに混和した。その後、この目的タンパク質の吸着した樹脂を ϕ 15mmのカラムに充填し、5mlのbuffer Aで2回洗浄した。次に5mlのbuffer B [20mM トリス-塩酸緩衝液(pH8.5)、100mM 塩化ナトリウム、1mM ジチオスレイトール、0.1%トライトンX-100、40mM イミダゾール]で樹脂を洗浄後、5mlのbuffer C [20mM トリス-塩酸緩衝液(pH8.5)、800mM 塩化ナトリウム、1mM ジチオスレイトール、0.1%トライトンX-100、40mM イミダゾール]、続いて5mlのbuffer Bで洗浄を行い目的以外の不要タンパク質の除去を行った。

【0059】

洗浄後、3mlのbuffer D [20mM トリス-塩酸緩衝液(pH8.5)、100mM 塩化ナトリウム、1mM ジチオスレイトール、0.1%トライトンX-100、100mM イミダゾール]で溶出操作を行った。次に、500mlのbuffer E [50mM トリス-塩酸緩衝液(pH8.5)、100mM 塩化ナトリウム、0.5mM EDTA、0.1%トライトンX-100、1mM ジチオスレイトール]で透析を行ない、その後、セントリコン(アミコン社製)を用いて約10倍(約300ml)まで濃縮を行なった。この精製濃縮サンプルの一部について10%SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動に供したところ、分子量約27,500のところに目的タンパク質のバンドが確認され、タンパク質濃度は約4mg/mlであった。さらに、当該サンプルについてAnti His HRP Conjugate (キアゲン社製)を用い、その添付プロトコルに従って抗Hisタグ抗体を用いたウエスタンブロッティング検出を行なったところ、目的のタンパク質バンドが発色検出された。

上記タンパク質は、Perfect DB配列、His tag配列ならびにFactor Xa配列等のアミノ酸配列を付加したものであり、配列表の配列番号5記載のアミノ酸配列を有するRNaseIII活性を有するポリペプチドである。

【0060】

実施例4 RNaseIII活性の測定

(1) dsRNA分解活性

上記実施例3-(2)で調製したRNaseIIIサンプルについてそのdsRNA分解活性を測定した。当該活性測定は以下のようにして行った。

まず、活性測定に用いた基質となるdsRNAは、TurboScript T7 T

ranscription kit (GTS社製)を用いて、その添付プロトコルに従って合成した。

すなわち、プラスミドpQBI125 (Quantum Biotechnologies Inc. 社製)に挿入されているRed-shift Green Fluorescent Protein (以下GFPと略称する)をコードする遺伝子(配列表の配列番号6)について、プラスミドpDON-AI (タカラバイオ社製)に挿入したpDON-rsGFPを鋳型とし、配列表の配列番号7記載のT7プロモーター配列をもったdsr-1プライマーと配列表の配列番号8記載のdsr-2プライマーを用いてPCRを行い、増幅産物を得た。次に得られた2本鎖DNAを鋳型として、T7 RNAポリメラーゼ (タカラバイオ社製)によるRNA合成反応により約700bpの長さのdsRNAを調製した。

【0061】

上記方法で調製したdsRNA 5 μ g、上記実施例3-(2)で調製したタンパク質サンプル 1 μ l、30mM 塩化マグネシウム溶液 1 μ l、5 \times 反応緩衝液 [250mM トリス塩酸緩衝液 pH8.5、1.25M 塩化ナトリウム、0.5% Triton X-100、5mM ジチオスレイトール]を2 μ l、これにnuclease free水を加えて、全量を10 μ lとしたものを反応液とした。

一方、対照となる市販の大腸菌由来のRNase III (EPICENTRE社製)の場合は、酵素液1 μ lを基質となるdsRNA 5 μ gに添加し、33mM トリス酢酸 (pH7.8)、66mM 酢酸カリウム、10mM 酢酸マグネシウム及び0.5mM ジチオスレイトールを含む緩衝液中で全量を10 μ lとしたものを反応液とした。

【0062】

以上の反応液を調製し、低温性微生物由来のRNase III活性を有するポリペプチドの場合は30 $^{\circ}$ Cで、また大腸菌由来のRNase IIIは37 $^{\circ}$ Cで一定時間時間反応後、5 μ lを15%ポリアクリルアミドゲル電気泳動、エチジウムブロマイドによる染色に供して切断産物の確認を行なった。

【0063】

その結果、低温性微生物由来のRNase III活性を有するポリペプチドで切断した産物は、30分間の切断でも100塩基対以上の分解産物が確認される部分分解の段階であり、1時間切断しても20塩基対よりも大きい切断断片が確認できた。また、一晚(約18時間)切断したものの、1時間切断したものとほぼ同様の切断パターンを示し、ヒト由来Dicerの切断産物である21塩基対よりも小さい、約20塩基対前後の長さのところにメインの分解産物が確認できた。一方、大腸菌由来のRNase IIIの場合、30分間切断すると約10塩基対前後の低分子分解物が主産物であることが確認できた。

以上のことから、本発明の低温性微生物由来のRNase III活性を有するポリペプチドでは、約10塩基対前後の低分子分解物が生じにくく、また部分分解による分解産物の調製が容易であることが確認できた。

【0064】

(2) 温度感受性の検討

上記実施例3-(2)で調製したRNase IIIサンプルについてそのdsRNA分解活性における温度感受性について検討した。対照として大腸菌由来のRNase III (EPICENTRE社製)を用いた。当該活性測定は以下のようにして行った。

すなわち、上記実施例3-(2)で調製したタンパク質サンプル 1 μ l、30mM 塩化マグネシウム溶液 1 μ l、5 \times 反応緩衝液 [250mM トリス塩酸緩衝液 pH8.5、1.25M 塩化ナトリウム、0.5% トライトンX-100、5mM ジチオスレイトール]を2 μ l、これにnuclease free水を加えて、全量を5 μ lとしたものを酵素液とし、30 $^{\circ}$ C、40 $^{\circ}$ C、50 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ Cで10分間及び20分間処理した。その後、実施例4-(1)で使用したdsRNAを5 μ gを加えて10 μ lとしたものを30 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。

【0065】

一方、対照の大腸菌由来RNase III (EPICENTRE社製) の場合は、酵素液1 μ lを33 mM トリス酢酸 (pH 7.8)、66 mM 酢酸カリウム、10 mM 酢酸マグネシウム及び0.5 mM ジチオスレイトールを含む緩衝液に加えて全量を5 μ lとしたものを反応液とし、40℃、50℃、60℃、70℃で10分間及び20分間処理した。その後、dsRNAを5 μ g加えて37℃で1時間反応させた。

反応終了後、これらの反応液5 μ lを15%ポリアクリルアミドゲル電気泳動、エチジウムブロマイドによる染色に供して切断産物の確認を行なった。

【0066】

その結果、低温性微生物由来のRNase III活性を有するポリペプチドの場合、50℃で20分間処理したものではdsRNA分解活性が確認されず、一方、大腸菌のRNase IIIの場合、60℃で20分間処理したもので活性が確認されなかった。

すなわち、低温性微生物由来のRNase III活性を有するポリペプチドは、大腸菌由来のRNase IIIと比較して、熱感受性が高く、より低い温度での失活が可能であることが判明した。

【0067】

実施例5

本発明の低温性微生物由来のRNase III活性を有するポリペプチドを用いて調製したsiRNAのRNA干渉の効果について検討した。対照として、市販の大腸菌由来RNase IIIを用いた。dsRNA分解産物の調製は、上記実施例4-(1)に記載の方法で行った。すなわち低温性微生物由来のRNase IIIの場合はdsRNA15 μ g分を、30℃、60分間で切断し、大腸菌RNase IIIの場合は、完全分解の場合、dsRNA15 μ g分を、37℃、60分間で切断し、また部分分解の場合は37℃で10分間切断して調製した。これらの切断産物をRNA Purification Column 1、2 (Gene Therapy Systems社製)を用いて精製し、これらを以下の評価に使用した。

【0068】

RNA干渉に関する評価は、以下のように行なった。

すなわち、siRNA導入を行なう24時間前に293細胞を、10%FBSおよび1%penicillin/streptomycinを含むD-MEM培地 (SIGMA社製)で適当量 (cell数: 5×10^4) 24well穴プレートに撒き、一晚CO₂インキュベーター内で培養した。約80%コンフルントになった状態で50 μ lの無血清培地に3 μ lのTransIT 293 Transfection Reagent (タカラバイオ社製)を加え、激しく攪拌した。室温で5分間放置し、0.3 μ gのpQBI25 (タカラバイオ社製)を加えて、穏やかに混和し、5分間室温で放置した。そこに4 μ lのTransIT-TKO試薬を加えて穏やかに混和し、室温で5分間放置した。そこに実施例4-(1)で調製したsiRNAを500 ng加えて穏やかに混和し、5分間室温で放置し、これをDNA/siRNA溶液とした。Well中の無血清培地を250 μ lになるように添加したものに、DNA/siRNA溶液を滴下し、Well内の溶液が均一になるように穏やかに混和を行なった。またコントロールとして、0.3 μ gのpQBI25のみを添加したもの、また滅菌水のみを加えたものも同時に行なった。その後CO₂インキュベーター内で24時間培養した。この細胞をFACS Vantage (ベクトン・ディッキンソン社製)を用いたフローサイトメトリーに供し、ベクター (DNA)のみを導入したものに対するDNA/siRNA溶液を導入した場合のGFP発現の阻害効果を測定した。その結果を表1に示す。

【0069】

【表1】

導入サンプル	平均蛍光強度
コントロール（無添加）	8.09
コントロール（ベクターのみ）	1331.44
大腸菌RNaseIII（完全分解）	1035.36
大腸菌RNaseIII（部分分解）	637.30
<i>Shewanella</i> sp. Ac10 RNaseIII	295.14

【0070】

表1に示したように、コントロール（ベクターのみ）と比較してその平均蛍光値が小さいほどRNA干渉が起こっている。従って、*Shewanella* sp. Ac10由来のRNaseIII分解物は、大腸菌由来のRNaseIIIの完全分解産物及び部分分解産物よりも強いRNA干渉 $nterference$ 効果を示すことが確認できた。

以上のことから、本発明の低温性微生物由来のRNaseIII活性を有するポリペプチドがRNA干渉のためのsiRNA調製に有用であることが確認できた。

【0071】

実施例6 dsRNA基質を変えた場合のRNaseIII活性

上記実施例3-(2)で調製したRNaseIIIサンプルについてそのdsRNA分解活性の基質となるdsRNAをルシフェラーゼ遺伝子より作製し評価した。実施例と同様にdsRNAは、TurboScript T7 Transcription kit（GTS社製）を用いて、その添付プロトコルに従って合成した。

【0072】

すなわち、プラスミドpGL3-Basicベクター（プロメガ社製）に挿入されているルシフェラーゼをコードする遺伝子について、プラスミドpGL3-Basicベクター（プロメガ社製）を鋳型とし、配列表の配列番号9記載のT7プロモーター配列をもったds1-1プライマーと配列表の配列番号10記載のds1-2プライマーを用いてPCR（増幅断片長約500塩基対）、前記ds1-1プライマーと配列表の配列番号11記載のds1-3プライマーを用いてPCR（増幅断片長約1000塩基対）を行い、2種類の増幅産物を得た。次に得られた2本鎖DNAを鋳型として、T7 RNAポリメラーゼ（タカラバイオ社製）によるRNA合成反応により約500bpの長さ及び約1000bpの長さのdsRNAを調製した。

【0073】

上記方法で調製したdsRNA 5 μ g、上記実施例3-(2)で調製したタンパク質サンプル 1 μ l、30mM 塩化マグネシウム溶液 1 μ l、5 \times 反応緩衝液 [250mM トリス塩酸緩衝液 pH8.5、1.25M 塩化ナトリウム、0.5%トライトンX-100、5mM ジチオスレイトール] を2 μ l、これにnuclease free水を加えて、全量を10 μ lとしたものを反応液とした。

以上の反応液を調製し、30℃で、一定時間時間反応後、5 μ lを15%ポリアクリルアミドゲル電気泳動、エチジウムブロマイドによる染色に供して切断産物の確認を行った。

【0074】

その結果、切断産物は、1時間切断しても20塩基対よりも大きい切断断片が確認できた。また、一晚（約18時間）切断したものでも、1時間切断したものとはほぼ同様の切断パターンを示した。

以上のことから、本発明の低温性微生物由来のRNaseIII活性を有するポリペプチドでは、鋳型を変えた場合及び長さを変えた場合においても、約10塩基対前後の低分子分解物が生じにくく、また部分分解による分解産物の調製が容易であることが確認できた。

【0075】

実施例7 dsRNA生産及び分解に寄与する因子の検討

(1) dsRNA 生産及び分解に寄与する因子を検討するために、常温域で核酸結合活性を有するタンパク質について検討した。

上記核酸結合活性を有するタンパク質は入手が困難である。従って、配列表の配列番号 12 記載のアミノ酸配列を有するサーモトガ マリティマ (*Thermotoga maritima*) 由来の CspB タンパク質をモデルタンパク質として用いた。当該タンパク質は、プロテインサイエンス (*Protein Science*) 第 8 巻、394-403 頁 (1999) 記載の方法で調製した。

【0076】

(2) サーモトガ・マリティマ由来 CspB の dsRNA 分解への効果

CspB を添加した形での dsRNA 分解活性は以下のように測定した。

すなわち、RNaseIII を酵素として用いた場合、実施例 3-(2) で調製したタンパク質サンプル (酵素液) $1\mu\text{l}$ 、上記 (1) で調製した CspB 溶液 $1\mu\text{l}$ 、基質となる dsRNA $1\mu\text{g}$ 、30mM 塩化マグネシウム溶液 $1\mu\text{l}$ 、5×反応緩衝液 [250mM トリス塩酸緩衝液 pH8.5、1.25M 塩化ナトリウム、0.5% トライトン X-100、5mM ジチオスレイトール] を $2\mu\text{l}$ 、これに *nuclease free* 水を加えて、容量を $10\mu\text{l}$ としたものを反応液とした。

CspB タンパク質の濃度は、それぞれ終濃度で $9.2\text{ng}/\mu\text{l}$ 、 $18.4\text{ng}/\mu\text{l}$ 、 $92\text{ng}/\mu\text{l}$ になるように添加し、無添加の場合のコントロールとして CspB の形状緩衝液である 10mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.5) を $1\mu\text{l}$ 添加した。

以上の反応液を調製し、30℃で 17 時間反応後、 $5\mu\text{l}$ を 15% ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、エチジウムブロマイドによる染色を行い切断産物を確認した。

【0077】

その結果、CspB 添加による dsRNA の分解の促進が確認できた。特に $9.2\text{ng}/\mu\text{l}$ の前後で分解が促進することが確認できた。

【産業上の利用可能性】

【0078】

本発明により反応条件による dsRNA 分解産物の長さの制御が容易な RNaseIII 活性を有するポリペプチドが提供される。該ポリペプチドは、RNA 干渉において最適な siRNA を調製することができる。また、本発明の方法により RNA 干渉等において有用な、siRNA の調製方法が提供される。さらに本発明の方法を簡便に実施することができる組成物ならびにキットが提供される。

【配列表フリーテキスト】

【0079】

SEQ ID NO:2; Synthetic primer 1 to amplify a gene encoding *Shewanella* sp.AC10 RNaseIII

SEQ ID NO:3; Synthetic primer 2 to amplify a gene encoding *Shewanella* sp.AC10 RNaseIII

SEQ ID NO:5; An expression peptide sequence of *Shewanella* sp.AC10 RNaseIII

SEQ ID NO:7; Synthetic primer dsr-1 to amplify a gene encoding red-shifted green fluorescence protein

SEQ ID NO:8; Synthetic primer dsr-2 to amplify a gene encoding red-shifted green fluorescence protein

SEQ ID NO:9; Synthetic primer dsl-1 to amplify a gene encoding luciferase

SEQ ID NO:10; Synthetic primer dsl-2 to amplify a gene encoding luciferase

SEQ ID NO:11; Synthetic primer dsl-3 to amplify a gene encoding luciferase

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> TAKARA BIO INC.

<120> A polypeptide which has a RNaseIII activity

<130> T-1854

<160> 13

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 678

<212> DNA

<213> Shewanella sp.Ac10

<400> 1

atggaaccca ttaaaaat	gccgcgtttg tgccgtactt taggttatga gttcaataat	60
attgaattac ttattcaggc	cttaacacat cgtagcgcag caaataaaca taatgagcgt	120
ttagagtttt taggtgattc	gattttatcg atagccattt cagatgcctt atatcatcag	180
tttccaaagg cgactgaagg	tgatttaagc cgaatgcgcg ccactttagt caaaggtgac	240
acgctgacaa tcatagctaa	agagttcaag ctaggtgatt atttgtattt aggtcctggt	300
gaactcaaaa gtggtggctt	tagacgcgaa tctattttag ctgatgctgt agaggctatt	360
attggtgctg tctatcttga	tgctgatatt gaagtgtgcc gcaagctatt attatcatgg	420
tatcaagagc gtttagctga	gattaaaccg ggtattaatc aaaaagatcc gaagacaata	480
ttgcaagaat acctgcaagg	ttttaaaaag ccattgcctg attaccaagt tgttgacagta	540
gaaggtgaag cccatgatca	aaccttcacc gtagaatgta aaattagtga attagataaa	600
gtgtgcaccg gtgtggcaag	ttcaagaaga aaagctgaac agcttgccgc tgctcaggta	660
ttggagctac tgaataaa		678

<210> 2

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic primer 1 to amplify a gene encoding Shewanella sp.AC10 RNaseIII

<400> 2

cagattccac gaattcgatg gaaccatta aaaatttgc

39

<210> 3

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic primer 2 to amplify a gene encoding Shewanella sp.AC10 RNaseIII

<400> 3

ggagaggctt ggatccttat ttattcagta gctcctt

37

<210> 4

<211> 226

<212> PRT

<213> Shewanella sp.Ac10

<400> 4

Met Glu Pro Ile Lys Asn Leu Pro Arg Leu Cys Arg Thr Leu Gly Tyr
1 5 10 15

Glu Phe Asn Asn Ile Glu Leu Leu Ile Gln Ala Leu Thr His Arg Ser
20 25 30

Ala Ala Asn Lys His Asn Glu Arg Leu Glu Phe Leu Gly Asp Ser Ile
35 40 45

Leu Ser Ile Ala Ile Ser Asp Ala Leu Tyr His Gln Phe Pro Lys Ala
50 55 60

Thr Glu Gly Asp Leu Ser Arg Met Arg Ala Thr Leu Val Lys Gly Asp
65 70 75 80

Thr Leu Thr Ile Ile Ala Lys Glu Phe Lys Leu Gly Asp Tyr Leu Tyr
85 90 95

Leu Gly Pro Gly Glu Leu Lys Ser Gly Gly Phe Arg Arg Glu Ser Ile

100

105

110

Leu Ala Asp Ala Val Glu Ala Ile Ile Gly Ala Val Tyr Leu Asp Ala
115 120 125

Asp Ile Glu Val Cys Arg Lys Leu Leu Leu Ser Trp Tyr Gln Glu Arg
130 135 140

Leu Ala Glu Ile Lys Pro Gly Ile Asn Gln Lys Asp Pro Lys Thr Ile
145 150 155 160

Leu Gln Glu Tyr Leu Gln Gly Phe Lys Lys Pro Leu Pro Asp Tyr Gln
165 170 175

Val Val Ala Val Glu Gly Glu Ala His Asp Gln Thr Phe Thr Val Glu
180 185 190

Cys Lys Ile Ser Glu Leu Asp Lys Val Val Thr Gly Val Ala Ser Ser
195 200 205

Arg Arg Lys Ala Glu Gln Leu Ala Ala Ala Gln Val Leu Glu Leu Leu
210 215 220

Asn Lys
225

<210> 5

<211> 243

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> An expression peptide sequence of Shewanella sp.AC10 RNaseIII

<400> 5

Met Asn His Lys Val His His His His His His Ile Glu Gly Arg Asn
1 5 10 15

Ser Met Glu Pro Ile Lys Asn Leu Pro Arg Leu Cys Arg Thr Leu Gly

20

25

30

Tyr Glu Phe Asn Asn Ile Glu Leu Leu Ile Gln Ala Leu Thr His Arg
35 40 45

Ser Ala Ala Asn Lys His Asn Glu Arg Leu Glu Phe Leu Gly Asp Ser
50 55 60

Ile Leu Ser Ile Ala Ile Ser Asp Ala Leu Tyr His Gln Phe Pro Lys
65 70 75 80

Ala Thr Glu Gly Asp Leu Ser Arg Met Arg Ala Thr Leu Val Lys Gly
85 90 95

Asp Thr Leu Thr Ile Ile Ala Lys Glu Phe Lys Leu Gly Asp Tyr Leu
100 105 110

Tyr Leu Gly Pro Gly Glu Leu Lys Ser Gly Gly Phe Arg Arg Glu Ser
115 120 125

Ile Leu Ala Asp Ala Val Glu Ala Ile Ile Gly Ala Val Tyr Leu Asp
130 135 140

Ala Asp Ile Glu Val Cys Arg Lys Leu Leu Leu Ser Trp Tyr Gln Glu
145 150 155 160

Arg Leu Ala Glu Ile Lys Pro Gly Ile Asn Gln Lys Asp Pro Lys Thr
165 170 175

Ile Leu Gln Glu Tyr Leu Gln Gly Phe Lys Lys Pro Leu Pro Asp Tyr
180 185 190

Gln Val Val Ala Val Glu Gly Glu Ala His Asp Gln Thr Phe Thr Val
195 200 205

Glu Cys Lys Ile Ser Glu Leu Asp Lys Val Val Thr Gly Val Ala Ser
210 215 220

Ser Arg Arg Lys Ala Glu Gln Leu Ala Ala Ala Gln Val Leu Glu Leu
 225 230 235 240

Leu Asn Lys

<210> 6
 <211> 720
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> red-shifted green fluorescence protein

<400> 6
 atggctagca aaggagaaga actcttcact ggagttgtcc caattcttgt tgaattagat 60
 ggtgatgtta acggccacaa gttctctgtc agtggagagg gtgaaggtga tgcaacatac 120
 ggaaaactta ccctgaagtt catctgcact actggcaaac tgcctgttcc atggccaaca 180
 ctagtcacta ctctgtgcta tgggtgttcaa tgcttttcaa gatacccgga tcatatgaaa 240
 cggcatgact ttttcaagag tgccatgccc gaaggttatg tacaggaaag gaccatcttc 300
 ttcaaagatg acggcaacta caagacacgt gctgaagtca agtttgaagg tgataccctt 360
 gttaatagaa tcgagttaaa aggtattgac ttcaaggaag atggaaacat tctgggacac 420
 aaattggaat acaactataa ctcacacaat gtatacatca tggcagacaa acaaaagaat 480
 ggaatcaaag tgaacttcaa gacccgccac aacattgaag atggaagcgt tcaactagca 540
 gaccattatc aacaaaatac tccaattggc gatggccctg tccttttacc agacaaccat 600
 tacctgtcca cacaatctgc cttttcgaaa gatcccaacg aaaagagaga ccacatggtc 660
 ctctttgagt ttgtaacagc tgctgggatt acacatggca tggatgaact gtacaactga 720

<210> 7
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic primer dsr-1 to amplify a gene encoding red-shifted green fluor

escence protein

<400> 7

gggtaatacg actcactata gggagaatgg ctagcaaagg ag

42

<210> 8

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic primer dsr-2 to amplify a gene encoding red-shifted green fluor
escence protein .

<400> 8

gggtaatacg actcactata gggagatcag ttgtacagtt ca

42

<210> 9

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic primer dsl-1 to amplify a gene encoding luciferase

<400> 9

gggtaatacg actcactata gggagaatgg aagacgccaa aa

42

<210> 10

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic primer dsl-2 to amplify a gene encoding luciferase

<400> 10

gggtaatacg actcactata gggagagaac gtgtacatcg ac

42

<210> 11

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> SEQ ID NO:11; Synthetic primer dsl-3 to amplify a gene encoding luciferas

e

<400> 11

gggtaatacg actcactata gggagaggca gatggaacct ct

42

<210> 12

<211> 66

<212> PRT

<213> Thermotoga maritima

<400> 12

Met	Arg	Gly	Lys	Val	Lys	Trp	Phe	Asp	Ser	Lys	Lys	Gly	Tyr	Gly	Phe
1				5					10					15	

Ile	Thr	Lys	Asp	Glu	Gly	Gly	Asp	Val	Phe	Val	His	Trp	Ser	Ala	Ile
			20					25					30		

Glu	Met	Glu	Gly	Phe	Lys	Thr	Leu	Lys	Glu	Gly	Gln	Val	Val	Glu	Phe
		35					40					45			

Glu	Ile	Gln	Glu	Gly	Lys	Lys	Gly	Pro	Gln	Ala	Ala	His	Val	Lys	Val
	50					55					60				

Val	Glu
65	

<210> 13

<211> 198

<212> DNA

<213> Thermotoga maritima

<400> 13

atgagaggaa aggttaagtg gttcgattcc aagaagggct acggattcat cacaaaggac 60

gaaggaggag acgtgttcgt aacttggtca gccatcgaaa tggaagggtt caaaactctg 120

aaggaaggcc aggtcgtcga gttcgagatt caggaaggca agaaagggtcc acaggcagcg 180

cacgtgaaag tagttgag 198

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

反応条件による dsRNA 分解産物の長さの制御が容易で、さらに RNA 干渉において siRNA として機能し得る長さの dsRNA を調製する際に、RNA 干渉の効果の低い低分子物のものが生じにくい RNase III 活性を有する新規ポリヌクレオチドを提供すること。また、該ポリヌクレオチドを用いた、従来とは異なったより効率的な siRNA の調製方法を提供すること。

【解決手段】

反応条件による dsRNA 分解産物の長さの制御が容易で、さらに RNA 干渉において siRNA として機能し得る長さの dsRNA を調製する際に、RNA 干渉の効果の低い低分子物のものが生じにくい RNase III 活性を有するポリペプチド、該ポリペプチドを用いた dsRNA 分解方法、該方法のための組成物ならびにキット。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 3 4 2 2 6 0

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[3 0 2 0 1 9 2 4 5]

1. 変更年月日

2 0 0 2 年 4 月 1 日

[変更理由]

新規登録

住 所

滋賀県大津市瀬田三丁目 4 番 1 号

氏 名

タカラバイオ株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.